

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Barbora Štádlerová

Stanovení celkového obsahu železa ve vybraných výživových
doplncích

Determination of total iron content in selected food
supplements

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 16. srpna 2016.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Jakubu Hraníčkovi, PhD. za odbornou pomoc při vedení práce v laboratoři i při jejím vypracování.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením celkového obsahu železa ve třech různých potravinových doplňcích pomocí tří analytických metod. Výživové doplňky zkoumané v této práci jsou Biovit C60, Hemofin a Aktiferrin Compositum. Použité metody jsou manganometrická titrace, atomová absorpční spektrometrie a sekvenční injekční analýza s UV/VIS spektrofotometrickou detekcí. Roztoky jednotlivých přípravků byly připraveny dvěma způsoby – rozpuštěním v deionizované vodě a pomocí mikrovlnného rozkladu. Mikrovlnný rozklad je vzhledem ke složení přípravků vhodnější metodou přípravy roztoků. Manganometrická titrace vzhledem k matici analyzovaných vzorků není vhodná pro stanovení celkového množství železa v těchto výživových doplňcích. Atomovou absorpční spektrometrií byl stanoven obsah železa technikou plamenové atomizace výpočtem z kalibrační závislosti. U metody sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí byl jako činidlo použit 1,10-fenantrolin, který se železnatými ionty tvoří červený komplex. Měření bylo prováděno při vlnové délce 512 nm. Hodnoty nejbližší hodnotám obsažených v příbalových informacích přípravků byly obdrženy při stanovení atomovou absorpční spektrometrií.

Abstract

In this bachelor's thesis a comparison of three analytical methods for total iron determination in three different food supplements is described. The examined food supplements are Biovit C60, Hemofin and Aktiferrin Compositum. The three methods used for determination of iron are manganometric titration, atomic absorption spectrometry and sequential injection analysis paired with spectrophotometric detection. Two methods were used to prepare solutions of each supplement – they were dissolved in distilled water and also prepared by microwave decomposition of samples. The microwave decomposition is definitely a more suitable preparation method in this case, considering the composition of each supplement. The least suitable of all three methods mentioned above has to be the manganometric titration due to the composition of the matrix. The calibration curve was used to determine total iron content by atomic absorption spectrometry with flame atomization. The agent used in sequential injection analysis to create a product, which can be detected by UV/VIS spectrophotometry was 1,10-phenantroline. The final product was red with the absorption maximum at 512 nm. The most accurate results were obtained by atomic absorption spectrometry.

OBSAH

Prohlášení	- 2 -
Poděkování	- 3 -
Abstrakt	- 4 -
Abstract	- 5 -
1 ÚVOD	- 8 -
1.1 Cíle bakalářské práce	- 8 -
2 TEORETICKÁ ČÁST	- 9 -
2.1 Železo	- 9 -
2.1.1 Výskyt železa v přírodě	- 9 -
2.1.2 Železo a jeho funkce v organismech	- 9 -
2.1.3 Poruchy spojené s funkcí železa v organismech	- 10 -
2.2 Metody stanovení železa	- 11 -
2.2.1 Manganometrické stanovení	- 11 -
2.2.2 Atomová absorpční spektrometrie	- 12 -
2.3 UV/VIS spektrofotometrie metodou sekvenční injekční analýzy	- 14 -
2.3.1 Srovnání průtokové a sekvenční injekční analýzy	- 14 -
2.3.2 Princip SIA	- 15 -
2.3.3 Spektrofotometrické stanovení železnatých iontů	- 16 -
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 17 -
3.1 Charakteristika vzorků	- 17 -
3.1.1 Aktiferrin compositum	- 17 -
3.1.2 Hemofin	- 17 -
3.1.3 Biovit C 60	- 17 -
3.2 Příprava vzorků k analýze	- 18 -
3.3 Manganometrická titrace	- 19 -
3.4 Atomová absorpční spektrometrie	- 19 -
3.5 UV/VIS spektrofotometrie metodou sekvenční injekční analýzy	- 20 -
4 Výsledky a diskuze	- 22 -
4.1 Manganometrická titrace	- 22 -
4.1.1 Statistické zpracování naměřených dat	- 22 -
4.2 Atomová absorpční spektrometrie	- 24 -
4.2.1 Optimalizace průtokové rychlosti acetyleny	- 24 -
4.2.2 Optimalizace výšky paprsku	- 25 -
4.2.3 Kalibrační závislost a základní charakteristiky stanovení	- 26 -
4.3 UV/VIS spektrofotometrie metodou sekvenční injekční analýzy	- 28 -
4.3.1 Kalibrační závislost a základní charakteristiky stanovení	- 30 -
5 ZÁVĚR	- 33 -
6 Použitá literatura	- 34 -

Seznam uvedených zkratk a symbolů

AAS	<i>atomová absorpční spektrometrie</i>
EDL	<i>bezelektrodová výbojka</i>
ETA-AAS	<i>atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací</i>
F-AAS	<i>atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací</i>
FIA	<i>průtoková injekční analýza</i>
HCL	<i>výbojka s dutou katodou</i>
l	<i>tloušťka absorbujícího prostředí</i>
N	<i>počet volných atomů v základním energetickém stavu v jednotce absorbujícího plynu v cm^3</i>
PSI	<i>jednotka tlaku (pound per square inch)</i>
s	<i>směrodatná odchylka</i>
s_r , RSD	<i>relativní směrodatná odchylka</i>
SIA	<i>sekvenční injekční analýza</i>
SV	<i>selekční ventil</i>
UV/VIS	<i>ultrafialová/viditelná oblast záření</i>
ϕ	<i>tok prošlého záření</i>
ϕ_0	<i>tok vstupujícího monochromatického záření</i>
χ	<i>monochromatický absorpční koeficient</i>
\tilde{x}	<i>medián</i>

1 ÚVOD

Železo je mikrobiogenní prvek, naše tělo ho potřebuje ke správnému chodu organismu. Nejdůležitější jeho umístění je v hemoglobinu, v krevním barvivu. Hemoglobin přenáší kyslík a oxid uhličitý a uskutečňuje tak proces dýchání. Výživové doplňky obsahující železo používají lidé v mnoha případech – ženy v těhotenství, lidé trpící chudokrevností či lidé, kteří podstoupili operace, při kterýchž ztratili velké množství krve.

Pro stanovení obsahu železa v přípravcích je důležité vhodně připravit jejich roztok. Přípravky kromě samotného železa obsahují ještě matrici, která se skládá z více látek, proto není možné je pouze rozpustit ve vodě. Stanovení železa se nejčastěji provádí atomovou absorpční spektrometrií. V této práci byly vyzkoušeny ještě další dvě metody – manganometrická titrace a sekvenční injekční analýza s UV/VIS spektrofotometrickou detekcí.

1.1 Cíle bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce bylo najít metodu vhodnou ke stanovení celkového obsahu železa obsaženého ve třech vybraných výživových doplňcích.

Jednotlivé úkoly byly následující:

- převedení jednotlivých vzorků do roztoku – rozpuštěním ve vodě a mikrovlnným rozkladem
- manganometrické stanovení iontů železa
- stanovení iontů železa atomovou absorpční spektrometrií
- optimalizace parametrů sekvenční injekční analýzy a následné stanovení iontů železa sekvenční injekční analýzou se spektrofotometrickou detekcí

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Železo

Čisté železo je poměrně měkký, kujný, lesklý a neušlechtilý kov. Železo je přechodný kov, v periodické tabulce se nachází v VIII. B skupině a ve 4. periodě. Má konfiguraci valenční sféry $4s^2 3d^6$ a dosahuje nejčastěji oxidačních stavů + II a + III. Železo se snadno rozpouští ve zředěných kyselinách, se kterými poskytuje železnaté soli. V oxidujících kyselinách, což je například kyselina dusičná, se železo pasivuje tvorbou nepropustné vrstvy oxidu, která by měla železo chránit před další reakcí [1,2].

2.1.1 Výskyt železa v přírodě

Železo se hojně vyskytuje ve vesmíru a je také hlavní součástí zemské kůry, kde je čtvrtým nejrozšířenějším prvkem, hned po kyslíku, křemíku a hliníku. Mezi hlavní sloučeniny železa patří například hematit neboli krevel (Fe_2O_3), magnetit (Fe_3O_4), limonit ($2Fe_2O_3 \cdot 3H_2O$), siderit ($FeCO_3$) a pyrit (FeS_2) [1]. Na redukci těchto rud je založena průmyslová výroba železa, kdy se rudy redukují koksem ve vysoké peci za přítomnosti vápence (k odstranění křemičitanů, se kterými vytváří strusku). Z takto zpracovaného železa se poté vyrábí čistší ocel [3].

2.1.2 Železo a jeho funkce v organismech

Železo je nejdůležitějším přechodným prvkem, zúčastňujícím se různých pochodů v živých systémech. Je velice důležitý nejen pro živočichy, ale i pro rostliny, které nejsou schopné růst v půdách deficitních na železo.

Tělo dospělého člověka obsahuje asi 4 g železa, z čehož přibližně 3 g připadají na hemoglobin. Bílkoviny obsahující železo mají hlavní funkci přenosu a uskladnění kyslíku a přenosu elektronů, některé slouží k transportu a uskladnění samotného železa. Tyto bílkoviny obsahující železo se dělí na základě toho, zda daná látka obsahuje ve své struktuře hem či nikoli. Hem je prostetická skupina obsahující atom železa Fe^{2+} ve středu tetrapyrrolového jádra. Hem obsahují hemoglobin, myoglobin a cytochromy. Bílkoviny bez přítomnosti hemu jsou transferrin, ferritin, hemosiderin a další, které slouží k vychytávání železa v organismu a jeho následnému uskladnění.

Hemoglobin je obsažen v červených krvinkách, které díky němu mají červenou barvu. Jeho biologickou funkcí je přenos kyslíku (O₂) v krvi z plic do svalů, kde je předán myoglobinu, který kyslík uskládá. Metabolickou oxidací glukosy pak může dojít k uvolnění energie, kdy konečným produktem je oxid uhličitý (CO₂) [1].

Hrubý denní příjem železa je asi 20 mg, z čehož se vstřebá méně než 10%. Regulace vstřebání železa je ovlivněna několika hlavními faktory: stávajícím množstvím železa právě se nacházejícím v organismu, erythropézou (tvorba červenýchrvinek) a nedávným příjmem železa (například vyšší dávkou železa ve výživovém doplňku). Míra absorpce se zvýší, pokud dochází železo uložené v organismu, či když je zvýšená produkce nových červenýchrvinek. Absorpci naopak sníží velká hodnota železa uloženého v organismu a nebo náhlá dávka většího množství železa [4].

2.1.3 Poruchy spojené s funkcí železa v organismech

Ionty Fe²⁺ mohou mít i negativní vliv na chod organismu. Pokud se vyskytují v těle jedince jako volné ionty, může docházet k jejich oxidaci peroxidem vodíku, kdy vzniká organismu nebezpečný hydroxylový radikál v reakci, která se nazývá Fentonova reakce.



Uvedené reakci brání transferrin, jehož funkce je vychytávání volných iontů železa, nebo ceruloplasmin, který oxidační železo na trojmocné [5].

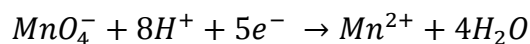
U člověka může nastat hyposiderémie (nedostatek železa) při nedostatku železa v potravě, následkem špatné absorpce či při chronickém krvácení. Rovněž i přebytek železa však může organismu uškodit. Jednak se může jednat o akutní nebo chronickou otravu železem, která může být smrtelná zejména u dětí či o dědičnou poruchu regulace absorpce železa v tenkém střevě. Této dědičné chorobě se říká hemochromatóza a může zapříčinit nadměrné ukládání železa v játrech a způsobovat tím cirhózu či v myokardu a tím způsobit kardiomyopatii [4].

2.2 Metody stanovení železa

Železo se vyskytuje ve vodě i v potravinách, ale v omezeném množství, proto spousta lidí na světě trpí jeho nedostatkem, především během dětství. Pro doplnění železa se užívají výživové doplňky obohacené o tento prvek. Analytické metody vhodné pro stanovení železa je nutno zajistit pro kontrolu množství železa. Kontrolovat se musí obsah železa v přírodních zdrojích i ve výživových doplncích, než se dostanou na trh [6]. Metod stanovení železa je mnoho, mezi nejvíce používané patří atomová absorpční spektrometrie, rozpouštěcí voltametrie, chemiluminescence, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a další [7].

2.2.1 Manganometrické stanovení

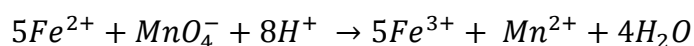
Manganometrická titrace patří mezi oxidačně redukční reakce. Je založena na oxidačních vlastnostech manganistanu draselného v kyselém a neutrálním prostředí. V kyselém prostředí, často v přítomnosti kyseliny sírové, působí manganistanové ionty jako silné oxidační činidlo, manganistanové ionty se redukují na ionty manganaté podle rovnice:



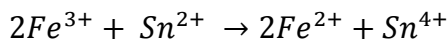
Díky intenzivnímu fialovému zabarvení odměrného roztoku manganistanu draselného se stanovení obejde bez indikátoru. První nadbytečná kapka odměrného činidla po dosažení bodu ekvivalence se projeví růžovým zabarvením titrovaného roztoku [8].

Roztok manganistanu draselného není stálý, samovolně se rozkládá. Jeho látková koncentrace se kvůli jeho nestabilitě musí kontrolovat pomocí standardních látek [9]. Pro standardizaci roztoku manganistanu draselného se používá dihydrát kyseliny šťavelové $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, oxid arsenitý As_2O_3 nebo hexahydrát síranu železnato-amonného (Mohrova sůl) $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [8].

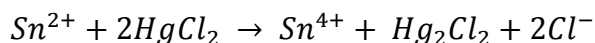
Stanovení železa vystihuje rovnice:



Vzorky solí železnatých obsahují vždy i ionty železité, které se před stanovením musí zredukovat na ionty železnaté pomocí chloridu cínatého podle rovnice:



Přebytečný chlorid cínatý, který by rušil stanovení tím, že by se oxidoval, se zoxидуje chloridem rtuťnatým přidaným v nadbytku:



Rtuťnaté ionty neruší stanovení oxidací železnatých iontů, protože jsou přidávány v podobě velmi málo disociovaného $HgCl_2$. Chloridové ionty se ale mohou oxidovat na elementární chlor, tato nežádoucí reakce se eliminuje přidavkem Reinhardt-Zimmermannova roztoku [8].

2.2.2 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je v dnešní době jedna z nejčastěji využívaných metod v analytické chemii. Používá se hlavně pro stanovení kovů v různých typech vzorků a matric [10]. AAS je optická metoda, která využívá měření absorpce vhodného elektromagnetického záření volnými atomy prvků v plynném stavu. Daný prvek absorbuje pro něj charakteristické záření, které odpovídá energii potřebné k přechodu atomu do excitovaného stavu. Při absorpci záření o dané energii atomy prvku v plynné fázi pohlcují energetická kvanta fotonů. Dochází tak k úbytku intenzity záření, velikost úbytku záření je dána Lambertovým-Beerovým zákonem ve tvaru:

$$\Phi = \Phi_0 \cdot e^{-\chi \cdot l \cdot N}$$

kde χ značí monochromatický absorpční koeficient pro uvažovaný přechod, N je počet volných atomů v základním energetickém stavu v jednotce absorbujícího plynu

v cm³, l představuje tloušťku absorbujícího prostředí, Φ je tok prošlého záření a Φ_0 tok vstupujícího monochromatického záření [11].

Přístroj pro AAS se skládá z těchto hlavních částí: zdroj primárního záření, absorpční prostředí s volnými atomy stanovovaného prvku v základním stavu, což zajišťuje atomizátor, monochromátor a detekční systém [12].

Ze zdroje primárního záření vystupuje záření jednotlivých emisních čar prvku, to poté prochází absorpčním prostředím, kde volné atomy prvku v plynném stavu absorbují určité vlnové délky dopadajícího záření. Monochromátor slouží k izolaci vybrané čáry, ostatní čáry šterbinou neprochází a v detektoru je následně detekováno zeslabení původního toku záření, pro detekci se většinou využívá fotonásobič [11].

Jako zdroje primárního záření se nejčastěji používají výbojky s dutou katodou (HCL), kde je dutá katoda tvořena stanovovaným prvkem, bezelektrodové výbojky (EDL) a laditelný barvivový laser [11]. HCL sestává ze skleněné baňky naplněné inertním plynem, například neonem či argonem, v baňce se nachází anoda i katoda. Dutá katoda je vyrobena z vysoce čistého stanovovaného prvku nebo je prvkem pokryta nosná katoda, která je vyrobena z kovu, který má chudé emisní spektrum. Anoda je z kovu s vysokou teplotou tání, například zirkonu či titanu [10,11]. EDL je také tvořena skleněnou baňkou s křemenným výstupním okénkem. Baňka výbojky je naplněna inertním plynem a vhodným množstvím prvku ve směsi jako těkavá sloučenina, což může být například halogenid kovů [11].

Atomy látek se do absorpčního prostředí dostávají ve formě volných atomů v plynném stavu procesem atomizace, která se odehrává v atomizátorech. Atomizace se dá provádět v plamenu, elektrotermicky nebo v křemenných atomizátorech. V plamenové technice (F-AAS) se k atomizaci využívá plamene realizovaného směsí paliva (acetylen) a okysličovadla (vzduch či oxid dusný), kapalný vzorek se do plamene zavádí nejčastěji pomocí pneumatického zmlžovače [11]. Funkce zmlžovače neboli nebulizéru je z kontinuálního proudu zkoumaného roztoku vytvořit mlhu z jemných kapiček [10]. Vzorek je přiváděn nasávací kapilárou do míchací komory. V míchací neboli mlžné komoře dochází k roztržení větších kapek na malé kapičky na tříštivé kuličce. Účinnost těchto pneumatických nebulizérů je velice malá, cca 10 %. To znamená, že pouze malá část vzorku je zmlžena na aerosol, zbytek nasátého roztoku odkape do odpadu. Účinnost zmlžení se dá zvýšit pouze použitím jiného typu zmlžovače, například hydraulického

nebulizéru [10,11]. V průběhu atomizace vzorku probíhá řada pochodů a koncentrace volných atomů se v různých částech plamene liší. Kvůli tomu musíme znát tzv. plamenový profil, který představuje rozložení hodnot měřeného signálu v závislosti na tom, jak vysoko nad hořákem bylo měření uskutečněno. Největší koncentrace atomů se nachází v oblasti mezi primární reakční zónou a mezireakční zónou. Tato oblast je nejdůležitější, a proto jí musí procházet optická dráha spektrometru. Nevýhody plamenového atomizátoru jsou silné naředění vzorku spalnými plyny (200 – 400 tisíckrát) a to, že se pro analýzu využije velice malý podíl analyzovaného vzorku [11].

Výhodou elektrotermické atomizace (ETA-AAS) je výrazně nižší spotřeba vzorku. Vzorek se dávkuje do speciální odporově vyhřívané kyvety, postupným zahříváním této kyvety průchodem elektrického proudu dochází k atomizaci. Hlavní výhodou bezplamenových atomizátorů je to, že celé nadávkované množství vzorku se posléze účastní absorpce primárního záření. Oproti F-AAS poskytuje ETA-AAS citlivější stanovení [11].

2.3 UV/VIS spektrofotometrie metodou sekvenční injekční analýzy

V roce 1990 byla vědci Marshallem a Růžičkou představena nová variace průtokové injekční analýzy (FIA) – sekvenční injekční analýza (SIA) [13]. FIA umožňuje rychlou analýzu velkého množství vzorků, jedná se o automatizovanou metodu. Vzorky jsou v intervalech zaváděny do kontinuálního nosného proudu činidla, který vzorky přenáší směrem k detektoru [14]. Vzorek je nasát do smyčky dvoupoložního injekčního ventilu. Jakmile je smyčka roztokem vzorku naplněna, ventil se otočí a vzorek je uveden přímo do kontinuálního proudu reagentu [15]. Činidlo je uskladněno v nádržce, ze které ho pohání hnací síla skrz celý systém hadiček či kapilár. Vzorek je vnášen přímo do proudu činidla, obě složky projdou nejprve míchací a reakční zónou a poté detekčním systémem [14]. V podstatě za chodu se vytváří produkt, který je možný nějakým způsobem detekovat [15]. Jedná se o průtokovou techniku, takže signál zaznamenaný z analýzy je závislý na čase analýzy [14], obdržíme signál ve formě píku [16].

2.3.1 Srovnání průtokové a sekvenční injekční analýzy

SIA má oproti FIA několik výhod. Spotřebuje se menší množství činidla než ve FIA, protože systém nepracuje kontinuálně, ale přerušovaně. Činidlo se nepoužívá jako

nepřerušovaný nosný proud vzorku [17]. Další výhodou SIA je, že při potřebě provedení jiné analýzy se nemusí měnit uspořádání přístroje, kdežto u FIA bylo často třeba vyměnit celý vícecestný systém [18,19]. Místo dvoucestného injekčního ventilu se používá multipoziční ventil [15]. Dalšími výhodami jsou jednoduchost provedení, rychlost, citlivost, reprodukovatelnost a flexibilita [20]. Celý systém SIA je plně ovládán počítačovým programem [6].

2.3.2 Princip SIA

Systém je tvořen injekčními pumpami, vícecestným selekčním ventilem (SV), reakční cívkou, peristaltickou pumpou, spojovacím materiálem, což jsou nejčastěji plastové hadičky, a vhodným detekčním systémem. Injekční pumpy slouží k nasávání vzorku a činidla a k vytvoření nosného proudu. Další součástí systému je multipoziční selekční ventil [16], který je ve středu celého přístroje, propojuje všechny jeho části a je plně ovládán počítačem [18]. Nejčastěji se jedná o SV s osmi pozicemi. SV zajišťuje připojení všech potřebných roztoků k systému, jejich aspiraci a také následný transport do detektoru. Reakční neboli mísicí cívka může sloužit buď pouze k promíchání jednotlivých zón nebo může obsahovat reaktivní náplň, jako např. pevné nosiče s imobilizovanými enzymy. Místo, kde se v systému cívka nachází, není vždy stejné. Často bývá jediná mísicí cívka umístěna mezi čerpadlo a SV. Další reakční cívka může být popřípadě umístěna před detektorem, což se využívá hlavně u pomaleji probíhajících reakcí [16].

Díky počítačovému programu, který ovládá celý systém, je možné současně kontrolovat činnost pumpy, která je hnací silou, a zároveň i SV. Ovládnutím těchto dvou komponent dosáhneme nasátí požadovaného objemu roztoků a určení směru toku. V klasickém uspořádání jsou nasávány objemy vzorku a činidla v jednotlivých sekvencích, dále procházejí vícecestným ventilem do reakční cívky. Otočením směru toku dojde k překrytí obou zón, zóny vzorku a zóny činidla. K tomuto překryvu přispívá disperze, a to jak axiální, tak i radiální. Výsledný produkt je dále poslán do detektoru, ze kterého je obdržen signál, jehož hodnota odpovídá určité koncentraci studované látky [21].

V SIA se používá mnoho různých typů detektorů, záleží na probíhající chemické reakci a na produktu, který je třeba stanovit. Často se používají zejména

spektrofotometrické, fluorescenční a elektrochemické detektory [16]. Mezi další patří např. hmotnostně spektrometrické, turbidimetrické či AAS detektory [21].

Technika SIA má široké pole využití. Využívá se v různých chemických oborech, často v environmentální chemii, biotechnologiích, při analýze potravin a nápojů či při kinetickém stanovení chemických reakcí. Také se dá využívat k monitorování v průmyslu [21].

2.3.3 Spektrofotometrické stanovení železnatých iontů

Spektrofotometrické stanovení železnatých iontů je často využíváno díky tomu, že ionty železa tvoří barevné komplexy s mnoha činidly. Mezi nejčastěji používaná činidla patří např.: thiokyanatanové ionty, 2,2'-bipyridyl a 1,10-fenantrolin. Železnaté ionty tvoří červený komplex s 2,2'-bipyridylem a s 1,10-fenantrolinem. Červeně zabarvený komplex 1,10-fenantrolinu a železnatých iontů má absorpční maximum při vlnové délce cca 510 nm. Železité ionty tvoří červený komplex s thiokyanatanovými ionty a žlutý komplex s 1,10-fenantrolinem. Existují i další činidla, která s ionty železa tvoří barevné komplexy, ale tyto tři se v praxi používají nejvíce. Například 1,10-fenantrolin se často využívá ke stanovení Fe^{3+} a Fe^{2+} díky tomu, že s oběma ionty tvoří jinak zabarvený komplex, který má tedy absorpční maximum v jiné vlnové délce [22].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Charakteristika vzorků

3.1.1 Aktiferrin compositum

Aktiferrin compositum je podlouhlá hnědá tobolka, obsah tobolky je žlutočervená olejovitá pasta. Ionty železa jsou vázány v podobě 113,85 mg hydrátu síranu železnatého (odpovídá 34,5 mg Fe^{2+}). V tobolce je dále obsaženo 129 mg racemického serinu, 0,5 mg kyseliny listové a 0,3 mg vitamínu B12. Pomocnými látkami jsou žlutý vosk, hydrogenovaný sójový olej, částečně hydrogenovaný sójový olej, čištěný řepkový olej, sójový lecithin, hydrogenfosforečnan vápenatý, nekrytalovatelný sorbitol, glycerol 85%, želatina, oxid železitý, oxid titaničitý. Přibližná hmotnost jedné tobolky je 0,7 g.

Přípravek Aktiferrin compositum se podává k předcházení nedostatku či při již existujícím nedostatku železa a kyseliny listové v období těhotenství či při ztrátách krve, např. po operacích či dárcevnosti krve. Komplex tvořený síranem železnatým a serinem se vyznačuje vysokou vstřebatelností železa, což vede k rychlému obnovení zásob železa v organismu.

3.1.2 Hemofin

Hemofin je šedivá kapsle, přibližná hmotnost jedné kapsle je 0,8 g. Přípravek je vhodný pro těhotné a kojící ženy či ženy v klimakteriu. Složení výrobku je následující: fumaran železnatý (odpovídající množství Fe^{2+} iontů je 20,0 mg), oxid hořečnatý, kyselina L-askorbová, DL- α - tokoferolacetát, pyridoxin-hydrochlorid, kyselina listová, oxid zinečnatý, selen, vitamin B12, želatina.

3.1.3 Biovit C 60

Biovit C 60 je zelená tableta a přibližná hmotnost jedné tablety odpovídá 0,5 g. Složení výrobku: oxid hořečnatý, laktosa, kyselina askorbová, fumaran železnatý (odpovídající množství 20,0 mg Fe^{2+}), glukonát zinečnatý, DL- α - tokoferolacetát, kvasnice obohacené selenem, hydroxypropylmethylcelulosa, hydroxypropylcelulosa, bavlníkový olej, oxid titaničitý, stearat hořečnatý, laktitol, brilantní modř, chinolinová žluť, vitamin B12, kyselina listová.

3.2 Příprava vzorků k analýze

Nejprve byly všechny tablety, ze kterých byly dále připravovány roztoky, zváženy. První sada roztoků byla připravena tak, že jednotlivé tablety byly rozpuštěny ve 100 ml deionizované vody. Pro urychlení rozpouštění byly roztoky zahřáty a dále byly vloženy do ultrazvukové lázně. Roztoky byly poté přefiltrovány pomocí injekční stříkačky přes filtrační nástavec. Roztoky všech tří přípravků byly naředěny 100x.

Druhá sada roztoků byla připravena odlišným způsobem, bylo použito mikrovlnného rozkladného zařízení MDS-2000 (CEM Corporation, USA) s vyžitím teflonových rozkladných patronek Lined Digestion Vessels. Do každé z nádob byl umístěn jeden ze tří výživových doplňků. Do nádob bylo pipetováno 5,0 ml koncentrované kyseliny dusičné a 2,0 ml koncentrovaného peroxidu vodíku. Nádobky byly uzavřeny, umístěny do karuselu a celý karusel byl umístěn do přístroje pro mikrovlnný rozklad. V průběhu mikrovlnného rozkladu byl programově zvyšován tlak. Nejprve byl tlak po dobu 10 minut 80 PSI, poté na 10 minut 100 PSI, na 20 minut 120 PSI a nakonec na 10 minut byl tlak nastaven na 140 PSI. Roztoky byly posléze naředěny 100x.

Každá řada roztoků byla připravována jiným způsobem. Všechny roztoky však byly naředěny na stejnou koncentraci. Koncentrace železa ve výsledných roztocích by měla odpovídat u Hemofinu a Biovitu C 2 mg/l, tj. 35,8 $\mu\text{mol/l}$ a u Aktiferrinu Compositum 3,45 mg/l, tj. 61,8 $\mu\text{mol/l}$.

3.3 Manganometrická titrace

Chemikálie

Síran manganatý tetrahydrát, p.a., pevný, (LachNer, ČR)

Kyselina fosforečná 85%, p.a., (Merck, Německo)

Kyselina sírová koncentrovaná 95-97%, (Merck, Německo)

Chlorid rtuťnatý, p.a., pevný, (Chemapol) – byl připraven 10% roztok

Chlorid cínatý, p.a., pevný, (Lachema, ČR) – byl připraven 5% roztok

Odměrný roztok manganistanu draselného ($c = 0,02 \text{ mol/l}$; $f = 1,0167$).

Pracovní postup

Do titrační baňky bylo pipetováno vždy 10,0 ml připraveného roztoku vzorku. Poté byla přidána kapka 5% roztoku chloridu cínatého, 0,5 ml 10% roztoku chloridu rtuťnatého a nakonec 10 ml Reinhardt-Zimmermannova roztoku (příprava: 6,7 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 20 ml H_3PO_4 hustoty 1,3 g/ml a 13 ml koncentrované H_2SO_4 ve 100 ml roztoku), bylo doplněno 20,0 ml deionizované vody. Příprava titrovaného roztoku byla provedena ještě druhým způsobem. Do titrační baňky bylo pipetováno vždy 10,0 ml roztoku vzorku, přidáno 15,0 ml kyseliny sírové ($c = 3 \text{ mol/l}$) a doplněno vodou na 100,0 ml. Roztok vzorku byl titrován odměrným roztokem manganistanu draselného, titrace každého vzorku byla provedena třikrát. Konec titrace byl určen podle objevujícího se fialového zabarvení.

3.4 Atomová absorpční spektrometrie

Spektrometr

Měření byla prováděna na přístroji GBC 933 AA (GBC Scientific Equipment, Australia) při vlnové délce 248,3 nm. Byla použita výbojka s dutou katodou pro stanovení železa. Průtoková rychlost acetyleny byla optimalizována, jako vhodná hodnota pro naměření kalibrace byl zvolen průtok acetyleny 2,5 l/hod. Výška plamene byla také optimalizována a pro kalibraci byla zvolena hodnota 7 jednotek stupnice.

Chemikálie

Standardní roztok železitých iontů o koncentraci 1 000 mg/l, vázaný na dusičnan železitý v 0,5 mol/l roztoku HNO_3 (Merck, Německo)

Kyselina dusičná, p.a., 65%, (Merck, Německo).

Pracovní postup

Byly připraveny roztoky kalibrační řady o koncentracích 1,0; 2,5; 5,0 a 10,0 mg/l. Roztoky byly připraveny ze zásobního roztoku železitých iontů o koncentraci 1 000 mg/l do 100ml odměrných baněk. Byla provedena měření v plamenu acetylen-vzduch a acetylen-oxid dusný, vždy byla stanovena optimální výška plamene a průtok paliva, poté byly naměřeny hodnoty absorbance pro roztoky kalibrační řady. Kalibrační řada byla proměřena v plamenu acetylen - vzduch. Dále byly proměřeny absorbance všech tří vzorků, přístroj udával průměrnou hodnotu ze tří měření s příslušnou směrodatnou odchylkou. Kalibrační křivka byla proměřena pro obě řady roztoků – rozpuštěné ve vodě i rozložené mikrovlnným rozkladem.

3.5 UV/VIS spektrofotometrie metodou sekvenční injekční analýzy

Chemikálie

1,10-fenantrolin, p.a., (Lachema, ČR)

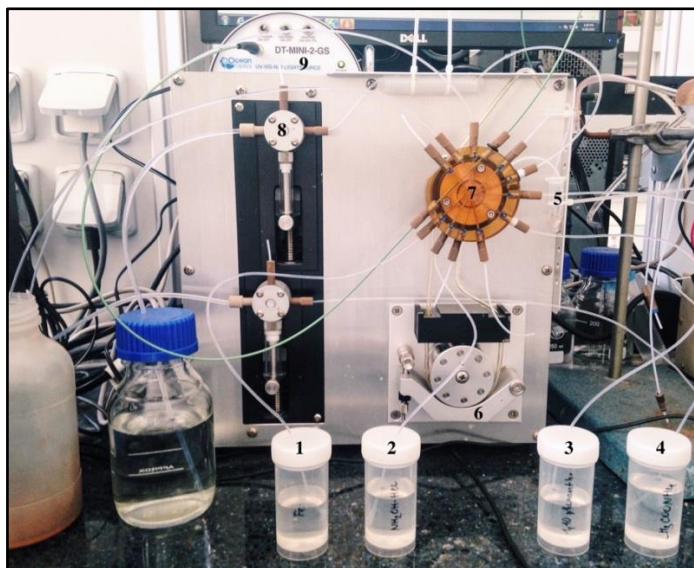
Octan amonný, p.a., (Lachner, ČR)

Hydroxylamin hydrochlorid, p.a., (Lachner, ČR)

Standardní roztok železitých iontů o koncentraci 1 000 mg/l, vázaný na dusičnan železitý v 0,5 mol/l roztoku HNO_3 (Merck, Německo)

Aparatura

Pro spektrofotometrické stanovení byl využit přístroj FIALab 3500 (FIALab Instruments, USA) s duální pumpou se spektrometrickým detektorem HR4000 (Ocean Optics, USA). Jako zdroj záření byl použit UV-VIS-NIR lightsource DT-MINI-2-GS s tungstenovou a deuteriovou lampou (Ocean Optics, USA). Schéma viz obr. 3.1.



Obr. 3.1: Schéma přístroje pro sekvenční injekční analýzu

1 – kalibrační roztok / vzorek , 2 – hydroxylamin hydrochlorid, 3 – 1,10-fenantrolin, 4 – octan amonný, 5 – vialka, 6 – peristaltická pumpa, 7 – multipoziční ventil, 8 – injekční pumpa, 9 – zdroj záření

Experimentální uspořádání

Experimentální uspořádání přístroje se v tomto případě liší od běžného uspořádání. Na obrázku 3.1 lze vidět vialku (č. 5), která je připevněná k přístroji. V běžném uspořádání by všechny roztoky byly nasáty přes vícecestný ventil (č. 7) a transportovány do reakční cívky. Při tomto uspořádání jsou však roztoky transportovány do vialky, kde dochází k účinnému promíchání pomocí peristaltické pumpy.

Program SIA byl nastaven následovně. Nejprve bylo nasáto 200,0 μl octanu amonného, dále 50,0 μl 1,10-fenantrolinu, 50,0 μl hydroxylaminu a 100,0 μl roztoku obsahujícího železo. Všechny roztoky byly nasávány rychlostí toku 25 $\mu\text{l/s}$. Roztoky byly posílány do vialky, kde byly promíchány probubláním vzduchem pohybem peristaltické pumpy. Roztok byl ponechán vždy po několik sekund ve vialce, aby došlo k dostatečnému vybarvení. Tento čas byl optimalizován, nejvyšší signál byl pořízen při prodlevě 30 s, všechny následující měření tedy byly prováděny s touto prodlevou.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V následujícím textu jsou diskutovány jednotlivé metody stanovení celkového obsahu železa ve vybraných potravinových doplncích. Metody jsou diskutovány v pořadí: manganometrická titrace, atomová absorpční spektrometrie, UV/VIS spektrofotometrie v uspořádání SIA.

4.1 Manganometrická titrace

Každý ze vzorků byl titrován třikrát. V přiložené tabulce (tab. 4.1) jsou uvedeny spotřeby odměrného roztoku manganistanu draselného v mililitrech a vypočítaná hmotnost celkového obsahu železa v jedné tabletě uvedená v gramech. Na závěr jsou zjištěná zastoupení železa porovnávána s certifikovanými hodnotami.

Tab. 4.1 Spotřeba odměrného roztoku manganistanu draselného při titraci a odpovídající množství železa.

<i>Vzorek</i>	<i>V KMnO₄ [ml]</i>	<i>m_{Fe} v tabletě [mg]</i>
<i>Biovit C60</i>	3,3	18,71
	3,4	19,27
	3,2	18,15
<i>Hemofin</i>	4,7	26,64
	5,0	28,48
	4,9	27,75
<i>Aktiferrin C.</i>	0,9	5,11
	0,7	3,97
	0,6	3,40

4.1.1 Statistické zpracování naměřených dat

Pro všechny tři vzorky bylo měření provedené třikrát a v rámci statistického zpracování byl jako výsledná hodnota uveden medián. Dále byla spočtena směrodatná (s) a relativní směrodatná odchylka (s_r) a interval spolehlivosti ($L_{1,2}$). K výpočtu byly použity tabelované hodnoty koeficientu k_n ($k_n = 0,591$) a K_n ($K_n = 1,3$) pro koeficient spolehlivosti 0,95.

Biovit C 60

$$\tilde{x} = 18,71 \text{ mg/tbl}$$

$$s = 0,591 \cdot 1,12 = 0,6619$$

$$s_r = \frac{0,6619}{18,71} \cdot 100 = 3,54 \%$$

$$L_{1,2} = 1,3 \cdot 1,12 = 1,456$$

Výsledný obsah železa v tabletě Biovit C 60 je $18,71 \pm 1,46$ mg/tbl (3,54 %).

Hemofin

$$\tilde{x} = 27,75 \text{ mg/tbl}$$

$$s = 0,591 \cdot 1,84 = 1,087$$

$$s_r = \frac{1,087}{27,75} \cdot 100 = 3,92 \%$$

$$L_{1,2} = 1,3 \cdot 1,84 = 2,392$$

Výsledný obsah železa v tabletě Hemofin je $27,75 \pm 2,39$ mg/tbl (3,92 %).

Aktiferrin Compositum

$$\tilde{x} = 3,97 \text{ mg/tbl}$$

$$s = 0,591 \cdot 1,71 = 1,011$$

$$s_r = \frac{1,011}{3,97} \cdot 100 = 25,47 \%$$

$$L_{1,2} = 1,3 \cdot 1,71 = 2,223$$

Výsledný obsah železa v tabletě Aktiferrin Compositum je $3,97 \pm 2,22$ mg/tbl (25,47 %).

Přípravky Biovit C60 a Hemofin by měly obsahovat 20,0 mg železa v jedné tabletě, Aktiferrin by měl obsahovat 34,5 mg železa. Výsledek u Aktiferrinu se významně liší od hodnoty napsané v příbalovém letáku. Jedna z hlavních příčin, proč je stanovené množství železa v tabletě tak nízké, je nejspíš způsob přípravy roztoku Aktiferrinu. Tobolka Aktiferrinu uvnitř obsahovala olejovitou hmotu, kterou nebylo možné zcela

rozpustit ve vodě. Po přefiltrování se tedy nejspíš většina železa nedostala do roztoku, který byl poté použit k manganometrickému stanovení titrací.

U všech tří roztoků nebylo při titraci jednoduché určit konec titrace podle změny zabarvení. Barva roztoku by se v bodě ekvivalence měla změnit na fialovou. Všechny tři roztoky se ale vždy po uplynutí určité doby zbarvily zpět na svou původní barvu. Změna barvy probíhala nejspíš proto, že roztok kromě iontů železa obsahoval spoustu dalších látek obsažených ve výživových doplncích, které mohly podléhat oxidačně-redukčním reakcím.

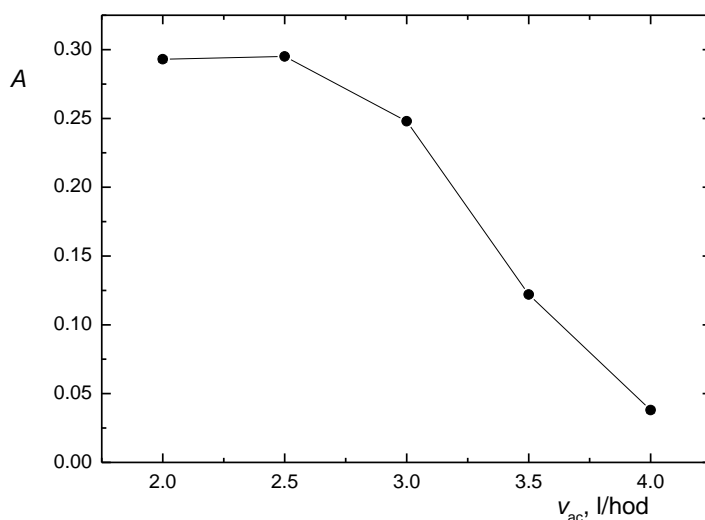
Z výše uvedených experimentů vyplývá, že výsledky přímého manganometrického stanovení celkového obsahu železa ve vybraných potravinových doplncích jsou silně závislé na formě tabletky a přítomné matici. Vzorky po mikrovlnném rozkladu nebyly touto metodou měřeny.

4.2 Atomová absorpční spektrometrie

4.2.1 Optimalizace průtokové rychlosti acetylenu

Prvním optimalizovaným parametrem u atomové absorpční spektrometrie byla průtoková rychlost paliva – acetylenu. Naměřené hodnoty absorbancí pro různé průtokové rychlosti jsou prezentovány níže v grafu (obr. 4.1).

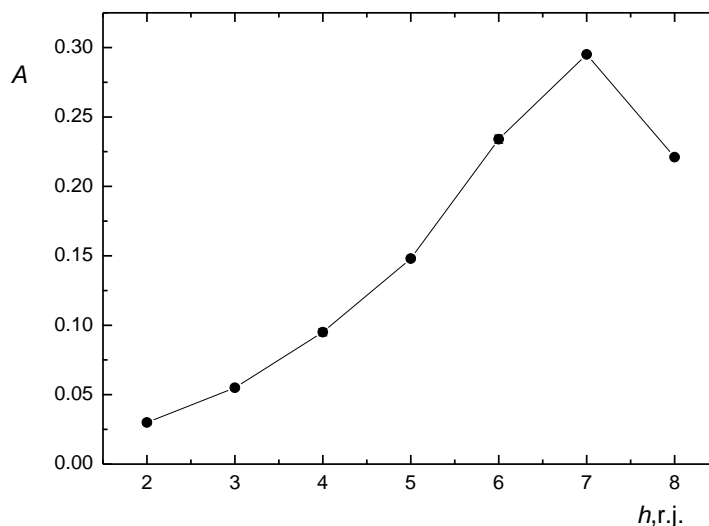
Pro další měření byla použita hodnota průtokové rychlosti, kdy byl obdržen nejvyšší signál při měření absorbance roztoku železitých iontů o koncentraci 5,0 mg/l. Zvolená hodnota odpovídala rychlosti průtoku acetylenu 2,5 l/hod. Průtok acetylenu byl měněn, průtok vzduchu byl nastaven na konstantní hodnotu 7,5 l/hod. Pro optimalizaci dalších parametrů AAS byl vždy použit roztok železitých iontů o koncentraci 5,0 mg/l.



Obr. 4.1 Závislost absorpance (A) na průtokové rychlosti acetyleny (v_{ac}).

4.2.2 Optimalizace výšky paprsku

Dalším optimalizovaným parametrem byla výška procházejícího paprsku nad hranou hořáku. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloženém grafu (obr. 4.2). Výška plamene je udávána v jednotkách uvedených na stupnici přístroje.

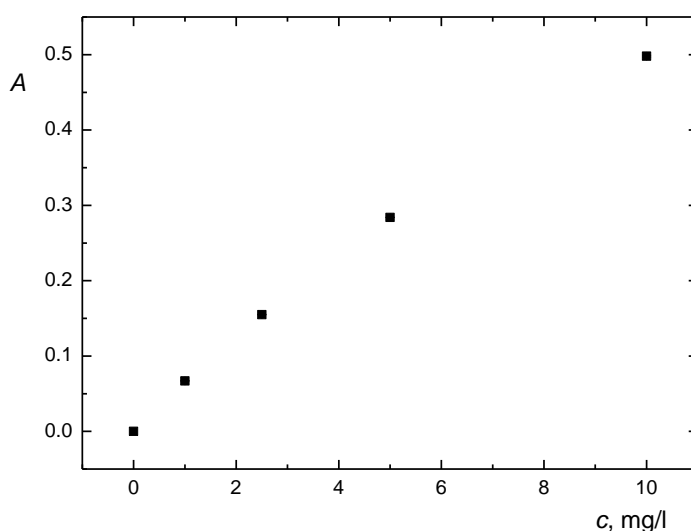


Obr. 4.2 Závislost absorpance (A) na výšce paprsku (h).

Jako vhodná výška paprsku nad hranou hořáku byla zvolena ta, při které byl obdržen nejvyšší signál, tedy hodnota 7. Další měření byla prováděna při výšce plamene 7, při průtoku acetyleny 2,5 l/hod a průtoku vzduchu 7,5 l/hod.

4.2.3 Kalibrační závislost a základní charakteristiky stanovení

Kalibrační závislost byla určena proměřením roztoků o koncentraci 1,0; 2,5; 5,0 a 10,0 mg/l železitých iontů za optimálních podmínek zjištěných v předchozích experimentech. Jako blank byla použita deionizovaná voda s přidavkem kyseliny dusičné (5 ml konc. HNO_3 na 1 000 ml H_2O). Dále byly zjištěny základní charakteristiky stanovení. Mez detekce a stanovitelnosti byla spočtena jako trojnásobek, resp. desetinásobek směrodatné odchylky signálů absorbance. Opakovatelnost byla vypočtena jako relativní směrodatná odchylka deseti měření koncentrace 10 mg/l železitých iontů. Lineární část kalibrační závislosti je uvedena na obrázku 4.3. Základní charakteristiky jsou pak shrnuty v tabulce 4.1.



Obr. 4.3 Kalibrační závislost pro roztoky připravené rozpuštěním přípravků v deionizované vodě. A - absorbance, c – koncentrace iontů železa v mg/l.

Tab. 4.1 Shrnutí základních charakteristik metody stanovení celkového železa.

<i>Charakteristika metody</i>	
Mez detekce* (mg/l)	0,1879
Mez stanovitelnosti** (mg/l)	0,6266
Citlivost (L/mg)	0,0746
Opakovatelnost (%)	0,59
Korelační koeficient	0,9932
LDR do (mg/l)	10
Pracovní rozsah do (mg/l)	25

* 3σ kritérium, ** 10σ kritérium

Po zjištění základních charakteristik stanovení celkového železa byly proměřeny roztoky daných výživových doplňků. Roztoky byly 100x naředěny, koncentrace železa tedy v roztoku Biovitu C a Hemofinu odpovídala 2,0 mg/l, v roztoku Aktiferrinu Compositum 3,45 mg/l. Z naměřených hodnot absorpance pro jednotlivé vzorky a z rovnice regrese byly dopočítány naměřené koncentrace roztoků vzorků.

Tab. 4.2 Obsah železa v jednotlivých výživových doplncích rozpuštěných ve vodě.

<i>Vzorek</i>	<i>Absorbance</i>	<i>RSD [%]</i>	<i>Koncentrace železa [mg/l]</i>	<i>Množství železa v tabletě [mg]</i>	<i>Deklarované množství železa v tabletě [mg]</i>
<i>Biovit C</i>	0,019	8,28	0,28	2,8	20,0
<i>Hemofin</i>	0,070	0,71	1,06	10,6	20,0
<i>Aktiferrin</i>	0,062	0,41	0,94	9,4	34,5

Výpočet celkového obsahu železa v roztoku byl proveden počítačem připojeným k přístroji, obdržené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4.2.

Za výše uvedených podmínek a výše uvedenou metodou byly ještě proměřeny roztoky vzorků připravených pomocí mikrovlnného rozkladu. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.3.

Tab. 4.3 Obsah železa v jednotlivých výživových doplncích rozložených mikrovlnným rozkladem stanovený atomovou absorpční spektrometrií.

<i>Vzorek</i>	<i>Absorbance</i>	<i>RSD [%]</i>	<i>Koncentrace železa [mg/l]</i>	<i>Množství železa v tabletě [mg]</i>	<i>Deklarované množství železa v tabletě [mg]</i>
<i>Biovit C</i>	0,184	0,47	1,973	19,73	20,0
<i>Hemofin</i>	0,158	0,60	1,625	16,25	20,0
<i>Aktiferrin</i>	0,301	0,12	3,542	35,42	34,5

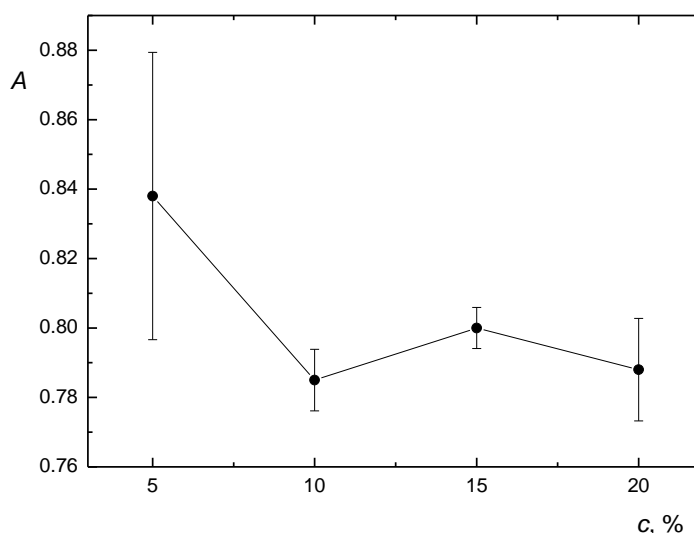
Hodnoty obsahu železa v jednotlivých tabletách vyšly rozdílné při různých přípravách roztoků vzorků. Z hodnot spočítaných u přípravků rozpuštěných pouze v deionizované vodě je vidět, že vypočítaná koncentrace železa v roztoku je mnohem nižší, než by být měla. Hodnoty odpovídají i tomu, jak dobře byl vzorek rozpustný. Nejlépe rozpustný byl Hemofin, jehož tobolka se dala rozevřít a prášek uvnitř byl pak rozpuštěn. Po rozpuštění Biovitu C na dně stále zůstávaly pevné částčky. Nejhůře byl rozpustný Aktiferrin. Aktiferrin byl lesklá tobolka naplněná olejovitou pastou, kterou nebylo možno ve vodě rozpustit. Při rozpouštění ve vodě byly všechny roztoky zahřáty a bylo použito

ultrazvuku. V roztoku Aktiferrinu stále zůstávaly zbytky olejovité pasty, které se po filtraci nedostaly do roztoku. Nízké hodnoty obsahu železa v tabletách byly pravděpodobně způsobeny obtížným rozpouštěním přípravků.

Z hodnot koncentrace železa v roztocích připravených mikrovlnným rozkladem je vidět, že se blíží mnohem více hodnotám napsaným v příbalových letácích přípravků.

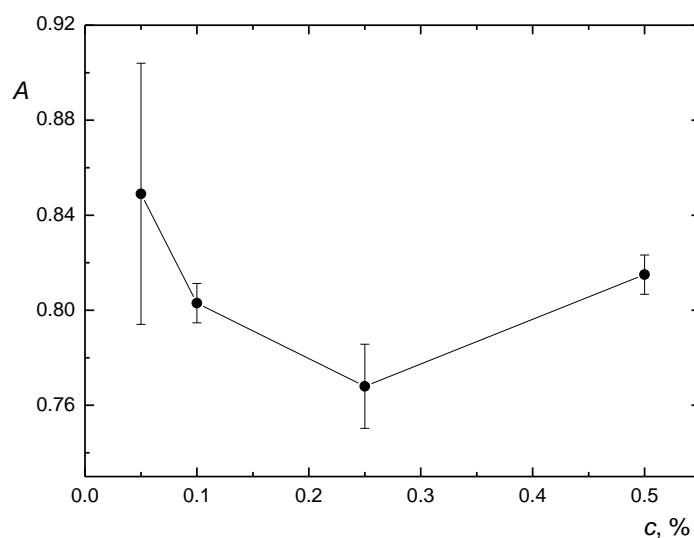
4.3 UV/VIS spektrofotometrie metodou sekvenční injekční analýzy

U metody SIA bylo třeba optimalizovat několik parametrů. Byly optimalizovány koncentrace všech použitých činidel – hydroxylaminu, 1,10-fenantrolinu a octanu amonného. Dále byla optimalizována doba, po kterou roztok setrval ve vialce, aby došlo k řádnému vybarvení oranžovočerveného produktu.



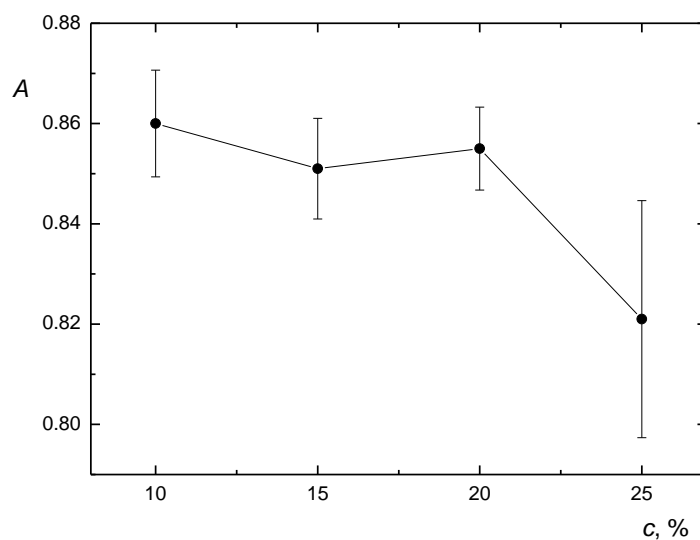
Obr. 4.5 Optimalizace koncentrace hydroxylaminu. A – absorbance, c – procentuální hmotnostní koncentrace hydroxylaminu.

Měření bylo provedeno s 5; 10, 15 a 20 % roztokem hydroxylaminu. Hodnota odezvy se příliš nelišila při různých koncentracích, proto byla další měření prováděna s koncentrací, která byla používána původně. V dalších měřeních byl nadále používán 10% roztok hydroxylaminu.



Obr. 4.6 Optimalizace koncentrace 1,10-fenantrolinu. A – absorbance, c – procentuální hmotnostní koncentrace 1,10-fenantrolinu.

Optimalizace koncentrace tohoto činidla byla prováděna s roztoky o těchto koncentracích: 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 %. Opět se intenzita signálu příliš neměnila při různých koncentracích, proto byl nadále používán 0,1% roztok 1,10-fenantrolinu, který byl používán původně.



Obr. 4.7 Optimalizace koncentrace octanu amonného. A – absorbance, c – procentuální hmotnostní koncentrace octanu amonného.

Měření byla provedena s těmito koncentracemi octanu amonného: 10, 15, 20 a 25 %. Stejně jako u předchozích dvou optimalizací se hodnota absorpance příliš neměnila s měněnou koncentrací octanu amonného. Proto byl nadále používán 20% roztok octanu amonného, který byl používán od počátku experimentu.

Původně při tomto experimentu byly používány tyto roztoky: 10% hydroxylamin, 0,1% fenantrolin a 20% octan amonný. S těmito roztoky byly provedeny kontrolní reakce v kádince. Zkoušelo se, zda se produkt správně vybarví a zda má na vybarvení vliv pořadí roztoků přidávaných do kádinky. Poté bylo už sekvenční injekční analýzou zkoumáno, při jaké koncentraci roztoků bude získán nejvyšší signál. Vzhledem k tomu, že se signál významně nelišil, signál většinou kolísal cca o 0,05 jednotek, bylo rozhodnuto, že se i nadále budou používat ty roztoky, které byly používány od začátku.

Dále byla optimalizována doba, po kterou byl roztok železa, hydroxylaminu, octanu amonného a 1,10-fenantrolinu, po probublání vzduchem, ponechán ve vialce. Měření byla provedena s pauzami: 5, 10, 15, 20, 30, 40 a 50 sekund. Nejvyšší signál byl pořízen s pauzou dlouhou 30 sekund, proto byla následující měření prováděna s takto dlouhou prodlevou mezi smícháním roztoků a jejich posláním do detektoru.

4.3.1 Kalibrační závislost a základní charakteristiky stanovení

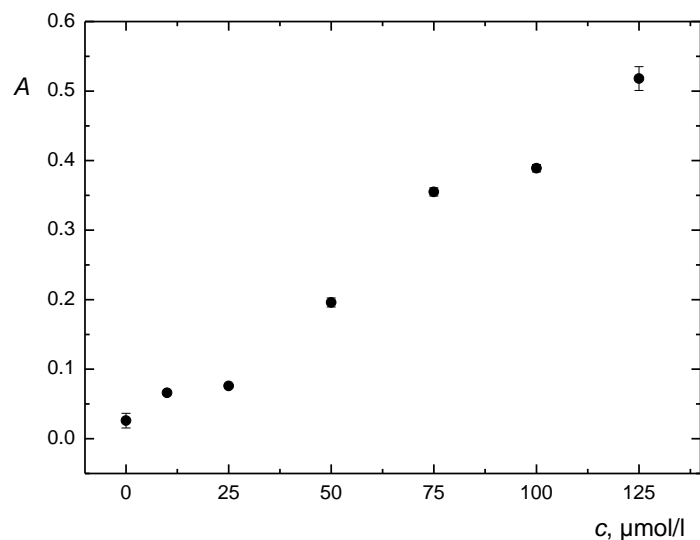
Byly zjištěny základní charakteristiky metody SIA. Mez detekce a stanovitelnosti byla spočtena jako trojnásobek, resp. desetinásobek směrodatné odchylky signálů absorpance. Opakovatelnost byla vypočtena jako relativní směrodatná odchylka deseti měření koncentrace 125 $\mu\text{mol/l}$ železitých iontů. Lineární část kalibrační závislosti je uvedena na obrázku 4.9. Základní charakteristiky jsou pak shrnuty v tabulce 4.4.

Tab. 4.4 Shnutí základních charakteristik metody stanovení celkového železa.

<i>Charakteristika metody</i>	
Mez detekce* ($\mu\text{mol/l}$)	7,17
Mez stanovitelnosti** ($\mu\text{mol/l}$)	23,90
Citlivost ($\text{l/}\mu\text{mol}$)	0,0040
Opakovatelnost (%)	1,86
Korelační koeficient	0,9799
LDR do ($\mu\text{mol/l}$)	125
Pracovní rozsah do ($\mu\text{mol/l}$)	125

* 3σ kritérium, ** 10σ kritérium

Dále byla proměřená kalibrační závislost metodou sekvenční injekční analýzy s UV/VIS spektrofotometrickou detekcí. Pro měření kalibrační závislosti byly použity roztoky s koncentrací železa: 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 125,0 $\mu\text{mol/l}$.



Obr. 4.9 Kalibrační závislost naměřená sekvenční injekční analýzou. A – absorbance, c – koncentrace iontů železa v $\mu\text{mol/l}$.

Když byla naměřena kalibrační závislost, byly změřeny naředěné roztoky vzorků. Byly proměřeny vzorky připravované oběma způsoby, tzn. rozpuštěné ve vodě i připravené pomocí mikrovlnného rozkladu. V následujících tabulkách (tab. 4.4 a tab. 4.5) jsou uvedeny hodnoty koncentrací v roztocích vzorků a následně i hodnoty celkového obsahu železa v jednotlivých přípravcích.

Tab. 4.5 Obsah železa v jednotlivých výživových doplncích rozpuštěných ve vodě stanovený sekvenční injekční analýzou.

<i>Vzorek</i>	<i>Absorbance</i>	<i>Koncentrace</i> <i>Fe³⁺ [$\mu\text{mol/l}$]</i>	<i>RSD [%]</i>	<i>Množství železa v</i> <i>tabletě [mg]</i>	<i>Deklarované množství</i> <i>železa v tabletě [mg]</i>
<i>Biovit C</i>	0,312	79,9	3,69	44,62	20,0
<i>Hemofin</i>	0,332	74,9	2,37	41,83	20,0
<i>Aktiferrin</i>	0,266	63,4	7,18	35,41	34,5

Tab. 4.6 Obsah železa v jednotlivých výživových doplňcích rozložených mikrovlnným rozkladem stanovený sekvenční injekční analýzou.

<i>Vzorek</i>	<i>Absorbance</i>	<i>Koncentrace</i> <i>Fe³⁺ [μmol/l]</i>	<i>RSD [%]</i>	<i>Množství Fe³⁺</i> <i>v tabletě [mg]</i>	<i>Deklarované množství</i> <i>železa v tabletě [mg]</i>
<i>Biovit C</i>	0,188	43,9	9,42	24,52	20,0
<i>Hemofin</i>	0,212	49,9	2,97	27,87	20,0
<i>Aktiferrin</i>	0,258	61,4	11,27	34,29	34,5

Z hodnot v tabulkách 4.5 a 4.6 je vidět, že výsledný celkový obsah železa v tabletách stanovený v roztocích připravených mikrovlnným rozkladem se mnohem více blíží hodnotám uvedeným u jednotlivých přípravků. Mikrovlnný rozklad byl rozhodně vhodnější k přípravě roztoků, které byly dále použity k analýze.

5 ZÁVĚR

V této práci bylo provedeno stanovení železa třemi různými metodami a u dvou metod byly použity roztoky připravené odlišným způsobem. Co se týče způsobu přípravy roztoků, mikrovlnný rozklad přípravků je určitě vhodnější než pouhé rozpuštění ve vodě. Výživové doplňky obsahují kromě železa i spoustu jiných sloučenin, z nichž všechny nemusí být dobře rozpustné ve vodě. Tyto sloučeniny pak mohou komplikovat rozpouštění celého přípravku a tím i snížit obsah železa ve výsledném přefiltrovaném roztoku.

Manganometrické stanovení v tomto případě nebylo nejvhodnější metodou stanovení železa. Bylo obtížné správně určit bod ekvivalence kvůli stálému odbarvování titrovaných roztoků. Manganometrická titrace je vhodnější ke stanovení železa v roztocích, o kterých víme, že neobsahují další látky, které by mohly stanovení nějakým způsobem narušovat.

Atomová absorpční spektrometrie je jednou z nejpoužívanějších metod stanovení železa. Je výhodná, protože je poměrně rychlá a ke stanovení železa nejsou potřeba další roztoky jako činidla. Celkový obsah železa v roztocích byl stanoven z kalibrační závislosti.

Sekvenční injekční analýza se spektrofotometrickou detekcí je metoda vhodná pro analýzu vícero roztoků. Ke spektrofotometrickému stanovení jsou kromě roztoků železa potřebné ještě další roztoky. Potřeba je hlavně činidla, které s ionty železa tvoří barevný komplex, který je pak možné detekovat. U metody SIA bylo třeba optimalizovat koncentrace jednotlivých činidel a dobu, která byla třeba k vybarvení produktu. Z kalibrační závislosti byl poté spočítán obsah železa v jednotlivých přípravcích.

Hodnoty nejvíce se blíží hodnotám uvedeným v informacích o přípravku na obale jsou hodnoty naměřené atomovou absorpční spektrometrií. Hodnoty obsahu železa v roztocích tablet připravených mikrovlnným rozkladem odpovídaly 19,73 mg/tbl pro Biovit C60, 16,25 mg/tbl pro Hemofin a 35,42 mg/tbl pro Aktiferrin Compositum. Hodnoty pro stejné roztoky získané sekvenční injekční analýzou odpovídaly 24,52 mg/tbl pro Biovit C60, 27,87 mg/tbl pro Hemofin a 34,29 mg/tbl pro Aktiferrin Compositum.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Greenwood, N.N.; Earnshaw, A.: Chemistry of the Elements, II. Oxford, Pergamon Press 1984.
- [2] Klikorka, J.; Hájek, B.; Votínský, J.: Obecná a anorganická chemie, III. Praha, SNTL 1983.
- [3] Lukeš, I.; Mička, Z.: Anorganická chemie II (systematická část). Praha, Karolinum 1998.
- [4] Marshall, W.J.; Baugert, S.K.: Clinical Chemistry. 6th ed. Philadelphia, Mosby/Elsevier 2008.
- [5] Racek, J.: Klinická biochemie. Praha, Galén/Karolinum 1999.
- [6] Araújo, A.N.; Gracia, J.; Lima, J.L.F.C.; Poch, M.; Lúcia, M.; Saraiva, M.F.S.: Colorimetric determination of iron in infant fortified formulas by sequential injection analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 357, 1153-1156 (1997).
- [7] Achterberg, E.P.; Holland, T.W.; Bowie, A.R.; Mantoura, R.F.C.; Worsfold, P.J.: Determination of iron in seawater. *Analytica Chimica Acta* 442, 1-14 (2001).
- [8] ach.upol.cz/user-files/files/acc-manganometrie.pdf
- [9] Suchánek, M.; Fogl, J.; Karhan, J.: Analytická chemie I. Praha, VŠCHT 1991.
- [10] Ganglitz, G; Moore, S.D.: Handbook of Spectroscopy, Vol. 2; 2nd ed. Weinheim, Wiley-VCH 2014.
- [11] Němcová, I; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: Spektrometrické analytické metody I. Praha, Karolinum 1997.
- [12] Klouda, P.: Moderní analytické metody. Ostrava, Pavel Klouda 1996.
- [13] Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R.: Principles of Instrumental Analysis, 6th ed. Belmont, Brooks/Cole 2007.
- [14] Harvey, D.: Modern Analytical Chemistry. US, McGraw-Hill Companies 2000.
- [15] Karlberg, B.; Pacey, G.E.: Flow Injection Analysis: A practical guide. Amsterdam, Elsevier Science Publishers 1989.
- [16] Paseková, H.; Polášek, M.; Solich, P.: Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy* 93, 354-359 (1999).

-
- [17] van Staden, J.F.; Botha, A.: Spectrophotometric determination of thiocyanate by sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta* 403, 279-286 (2000).
- [18] Feng, S.; Guo, Z.; Fan, J.: Kinetic spectrophotometric determination of total iron by sequential injection analysis. *Chemical Analysis* 50, 615-623 (2005).
- [19] Trojanowicz, M.: *Advances in flow analysis*. Weinheim, Wiley-VCH 2008.
- [20] Pragourpun, K.; Sakee, U.; Fernandez, C.; Kruanetr, S.: Deferiprone, a non-toxic reagent for determination of iron in samples via sequential injection analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 142, 110-117 (2015).
- [21] Pimenta, A.M.; Montenegro, M.C.B.S.M.; Araújo, A.N.; Martínez Calatayud, J.: Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40, 16-34 (2006).
- [22] Niedzielski, P.; Zielinska-Dawidziak, M.; Kozak, L.; Kowalewski, P.; Szlachetka, B.; Zalicka, S.; Wachowiak, W.: Determination of Iron Species in Samples of Iron-Fortified Food. *Food Analysis Methods* 7, 2023-2032 (2014).